

(Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel
[Vorsteher: Prof. Dr. Karl Bernhard].)

Beitrag zur Charakterisierung der Kynureninase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Stefan Grünstein

(Košice, ČSR)

STANFORD MEDICAL LIBRARY

BASEL 1952

BUCHDRUCKEREI FRIEDRICH REINHARDT AG., BASEL

Tag der Promotion
Basel, den 12. März 1952.

Von der Medizinischen Fakultät genehmigt auf Antrag von
Herrn Professor *Bernhard*.

Einleitung

Seit den Untersuchungen von Ellinger über den Tryptophanabbau gewann die Kynureninase in der Biochemie eine gewisse Bedeutung. Ellinger, Kotake und Nakayama stellten in ihren Arbeiten über Tryptophanabbau fest, daß aus Tryptophan neben Anthranilsäure auch Kynurensäure entsteht und an dem Abbau ein Enzym beteiligt ist, das von Kotake und Mitarbeiter Kynureninase benannt wurde.

Dieses Enzym gewann aber auch noch weiter an Bedeutung, nachdem Krehl und andere Autoren Beziehungen gefunden haben zwischen der Pellagra und Störungen im Tryptophanabbau.

Es wäre demnach möglich, daß Kynuren-ähnliche Stoffe in den Tryptophanabbau als Konkurrenzstoffe eingreifen und einen Teil der Kynureninase beanspruchen und damit die Nikotinsäurebildung hemmen.

Um diese Möglichkeiten prüfen zu können, war es aber nötig, die Kynureninase richtig zu charakterisieren.

Charakterisierung der Kynureninase

Schon Y. Kotake und Nakayama begannen mit der Charakterisierung der Kynureninase. Sie wählten als Methode zum Nachweis der Kynureninasewirkung die bei der Spaltung entstehende quantitative Anthranilsäurebestimmung, und zwar kolorimetrisch nach Otani und Nisikawa.

Mit dieser Methode haben die Autoren das pH Optimum für die Kynureninase ermittelt. Es zeigte sich, daß bei pH 7,3 die Kynureninase am wirksamsten war, d. h. daß bei diesem pH am meisten Anthranilsäure abgespalten wurde.

Dieselben Autoren haben dann Versuche mit Lebern verschiedener Tierarten ausgeführt, um zu ermitteln, ob Kynureninase bei allen Tierarten vorkommt und wie wirksam sie ist. Es zeigte sich, daß von Katzen-, Ratten-, Maus-, Meerschweinchen-, Hund- und Kaninchenleberextrakten die Katzenleberextrakte am wirksamsten, die Kaninchenleberextrakte am wenigsten wirksam waren.

Um die weitere Charakterisierung bemühte sich O. Wiss. Dieser Autor arbeitete auch mit Rattenleberextrakt und zum Teil auch mit Lebertrockenpulver nach Azeton-Extraktion. Auch dieses Trockenpulverextrakt hat sich als wirksam erwiesen.

Als Methode wurde hier die quantitative Bestimmung des gebildeten Alanins gewählt nach O. Wiss. Man konnte auch mit dieser Methode

das pH Optimum bei 7,3—8 ermitteln. Außerdem konnte man nachweisen, daß Phosphationen auf das Enzym aktivierend wirken. Zu diesen Zwecken benützte man in der Versuchsanordnung statt Phosphatpuffer Boratpuffer im optimalen pH-Bereich. Es zeigte sich, daß bei dieser Versuchsanordnung die Kynureninspaltung bis auf ein Minimum zurückgeht, nach Zusatz von kleinsten Mengen von Phosphat oder Pyrophosphat die abgespaltenen Alaninwerte rapid ansteigen, was deutlich die Aktivierung des Enzyms anzeigt.

O. Wiss hat auch Abbauversuche mit dl-Kynurenin und l-Kynurenin angestellt. Dabei zeigte es sich, daß nur l-Kynurenin abgebaut wird, nicht aber d-Kynurenin. Bei dl-Kynurenin wurde nur die l-Kynurenin entsprechende Menge abgebaut. Es zeigte sich sogar, daß d-Kynurenin eine hemmende Wirkung auf den Abbau von l-Kynurenin ausübt.

Um zu dieser Charakterisierung beizutragen, haben wir unsere Versuche mit der Kynureninase ausgeführt.

Beitrag zur Charakterisierung der Kynureninase

Symptomatologie der Pellagra

Die Pellagra als einheitliches Krankheitsbild ist erst seit dem achtzehnten Jahrhundert bekannt. Man hat sie zuerst in Spanien und Oberitalien beschrieben. Außer diesen Gegenden ist sie aber auch noch in Rumänien, in bestimmten Gegenden Nordamerikas und teilweise auch auf dem Balkan endemisch gewesen. In Rumänien und Jugoslawien kommt sie auch heute noch ziemlich häufig vor.

Die Krankheitserscheinungen der Pellagra sind vielseitig; die Krankheit selbst hat verschiedene Verlaufsformen. Im Vordergrund stehen die Hauterscheinungen. Besonders die der Sonne ausgesetzten Körperteile, wie Hände, Füße, Gesicht, werden betroffen.

Die Schädigungen an der Haut können in leichteren Fällen nur in Rötung und Flecken bestehen. Bei den schwereren Verlaufsformen aber kommt es bis zur Bläschenbildung, wobei die symmetrische Anordnung charakteristisch ist. Die befallene Haut wird dann mit der Zeit schuppig und braunschwarz, die Fingernägel werden dick und brüchig.

Weitere Schädigungen betreffen den Intestinaltrakt. Die Zunge wird tiefrot, dick und rissig und dabei sehr schmerzhaft. Die Mundschleimhaut ist entzündlich gerötet. Es kommt zu gastroenteritischen Erscheinungen, wie Übelkeit, Erbrechen, starken Diarrhoen und blutig-schleimigen Stühlen. Die Darmmucosa ist geschrumpft, mit Schleim bedeckt und neigt zu Ulcusbildung.

Charakteristisch für Pellagra sind weiterhin die Schädigungen im Nervensystem. Man findet häufig Hirnoedeme und hyperaemisierte Hirnteile, andere Gehirnbezirke sind geschrumpft und blutarm. Die

Hirnhäute sind dick, geschwollen und trübe. Im Rückenmark ist die Marksubstanz teilweise geschwunden, und in der Rindensubstanz findet man Schwellungen und Pigmenteinlagerungen. Diese neurologischen Symptome sind alle degenerativer und nicht entzündlicher Natur.

Aetiologie der Pellagra

Schon seit langer Zeit hat man nach der Aetiologie dieser so breite Volksmassen ergreifenden Krankheit gesucht. Im Laufe der Zeit sind verschiedene Theorien entstanden, welche durch spätere Untersuchungen teilweise bestätigt und teilweise widerlegt wurden. Die meisten Theorien gingen von den Beobachtungen aus, daß die Pellagra besonders in solchen Gegenden endemisch ist, in denen sich die Bevölkerung hauptsächlich mit Mais ernährt.

1. Die Maisernährung als ätiologischer Faktor der Pellagra.

Da, wie schon oben erwähnt, die Pellagra-Erkrankungen besonders in solchen Gegenden vorkamen, wo die Bevölkerung sich überwiegend mit Mais ernährte, lag es auf der Hand, daß man zwischen Pellagra und Maiskonsumation einen Zusammenhang vermutete.

Schon Goldberger wies in seinen klassischen Versuchen darauf hin, daß die Pellagra durch irgendeinen Diätfehler hervorgerufen wird. Er stellte mit Pellagrakranken Versuche an, wobei er bestimmte Faktoren der Diät kontrollieren konnte, und verabreichte seinen Patienten eine Diät, die genügende Mengen an Mineralien und Vitaminen enthielt. Es traten trotzdem die Pellagrasymptome auf, was darauf hinwies, daß weder ein Mangel an Mineralien, noch an Vitaminen eine essentielle Rolle bei der Pellagra-Erkrankung und -Prophylaxe spielen. Goldberger und Mitarbeiter konnten jedoch an Hand zahlreicher klinischer Beobachtungen zeigen, daß Pellagrakranke durch Verabreichung von Nikotinsäure und Nikotinsäureamid geheilt werden konnten.

Nachdem es Shell und Wright gelungen war, mit Hilfe einer mikrobiologischen Methode die Nikotinsäure quantitativ auch in Lebensmitteln nachzuweisen, sind in bezug auf eine Wechselwirkung zwischen Pellagra und Maisernährung verschiedene Zweifel aufgetaucht. Es hat sich nämlich durch diese mikrobiologischen Nikotinsäurebestimmungen gezeigt, daß Mais gar nicht arm an Nikotinsäure ist, sondern sogar mehr Nikotinsäure enthält als z. B. Milch, welche schon seit langem zur Unterstützung der Pellagratherapie gedient hat. Diese Diskrepanz zwischen Nikotinsäuregehalt der Pellagra erzeugenden Maisdiät und Pellagraerkrankung wurde auch aus den Arbeiten von Aykroyd und Swaminathan ersichtlich. Sie wiesen nach, daß in Rumänien bei vorwiegender Maisdiät mit annähernd 15 mg Nikotinsäuregehalt pro Tag Pellagra epidemisch vorkommt, wogegen man in Indien bei einer vorwiegenden Reisdiät mit wenig Nikotinsäure kaum Pellagra findet. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, daß keine Theorie für die Aetiologie der

Pellagra befriedigend ist, die nicht erklärt, warum Maiskonsumenten eine Neigung zu Pellagra-Erkrankung haben.

Aus dieser Überlegung stellte man an der Wisconsin-Universität Versuche an, indem man den erhöhten Nikotinsäurebedarf bei Maisdiät zu klären versuchte. Die Versuche wurden an Hunden und Ratten ausgeführt.

a) Versuche am Hunde:

Der Symptomkomplex bei Nikotinsäuremangel am Hunde wurde schon vorher von Handler studiert. Es zeigte sich, daß die von früheren Autoren angewandte «Blacktongue» erzeugende Diät nicht besonders arm an Nikotinsäure war, wie das die quantitativen Nikotinsäurebestimmungen zeigten. Die bei diesen Versuchen angewandte Diät bestand aus 70% Gelbmais und 18% Casein und enthielt also 1,4 mg% Nikotinsäure. Mit dieser Diät würde aber ein Hund bei Nahrungsaufnahme von 35 g pro kg Körpergewicht 25% mehr Nikotinsäure bekommen als das Minimalbedürfnis eines erwachsenen Hundes ist. Diese Minimalwerte wurden durch Schaeffer und Mitarbeiter durch Fütterungsversuche mit synthetischer Diät bestimmt. Diese Autoren konnten die «Blacktongue»-Symptome mit Anorexie, Entzündungen des Gaumens usw. mit einer an Vitamin B-Komplex und besonders an Nikotinsäure armen, synthetischen Diät erzeugen. Es zeigte sich, daß Tagesdosen von Nikotinsäure im Minimum 200—225 Gamma pro kg Körpergewicht nötig waren, um die Wachstumshemmung zu verhindern. Krehl und Mitarbeiter konnten zeigen, daß man zu einer künstlichen Diät mit 10% Casein und 60% Maiskorn dreimal soviel Nikotinsäure zugeben mußte wie zu einer maislosen Diät, um bei Hunden das gleiche Wachstum zu erreichen. Mit der Reduktion des Maiszusatzes konnte man auch parallel die Nikotinsäure reduzieren.

Aus diesen und früheren Beobachtungen kann man schließen, daß eine Diät, eine bestimmte Menge von Maiskörnern enthaltend, die Hunde zum «Blacktongue» praedisponiert, oder, anders formuliert, einen Mehrbedarf an Nikotinsäure verursacht.

b) Versuche an der Ratte:

Ähnliche Versuche wie mit dem Hunde haben Krehl und Mitarbeiter auch mit der Ratte durchgeführt. Ratten wurden auf eine synthetische Diät gestellt und ihr Wachstum registriert. Es zeigte sich, daß 40% gelber Mais in der Grunddiät eine Wachstumshemmung bewirkt, die durch Zugabe von 1% Nikotinsäure behoben werden kann. Ferner zeigte sich, daß die schädliche Wirkung von Mais aufgehoben oder geschwächt wird, wenn die Grunddiät Glucose oder statt 15% 20% Casein (mehr als 0,005 mg Nikotinsäure enthaltend) enthält. Interessanterweise hat Milch, welche sehr arm an Nikotinsäure ist (0,8 mg pro ccm) die Wachstumshemmung verhindert.

Die Tiere mit dem Maiszusatz zeigten außer Wachstumshemmung

eine Alopecie, raues Fell und rötliche Pigmentierungen an Tatzen, Nase usw.

Krehl und Mitarbeiter konnten außerdem nachweisen, daß bei Maisverfütterung der Nikotinsäuregehalt der Rattenleber abnimmt.

Außer Nikotinsäure hat Krehl Nikotinsäureamid, Aethylnicotinat, N-phenylnicotinsäureamid und N-methylnicotinamid auf ihre Wirksamkeit geprüft. Es erwiesen sich nur Nikotinsäure, Nicotinamid und Ethylnicotinat als wirksam gegen Pellagra bei Ratten.

Gestützt auf diese und auf die am Hunde gemachten Beobachtungen ist es klargeworden, daß eine Diät mit Mais eine vermehrte Nikotinsäurezufuhr für den Organismus notwendig macht. Da die Verhütung der schädigenden Wirkung des Maises bei Zusatz von größeren Caseinmengen nicht auf den erhöhten Nikotinsäuregehalt des Caseins zurückzuführen war, suchte man nach anderen wirksamen Faktoren.

2. Die Rolle des Proteinmangels bei der Entstehung der Pellagra.

Schon Lussana und Frua haben in Italien im Jahre 1857 (Harris) darauf hingewiesen, daß Mangel an bestimmten Proteinen bei der Aetiology der Pellagra mit eine Rolle spielt.

Goldberger und Tanner konnten dann durch ihre klinischen Beobachtungen auf die Wichtigkeit der Milch- und Fleischproteine bei der Verhütung und Therapie der Pellagra hinweisen.

Sie behandelten acht eindeutige, aber nicht sehr schwere Fälle von Pellagra mit einer Diät, die als einzigen therapeutischen Faktor Ochsenfleisch enthielt. In allen acht Fällen erzielten sie eine klinische Besserung. Vier von den Fällen wurden eine Zeitlang statt mit Ochsenfleisch mit Gelatine behandelt. Diese Ernährung mit der Gelatine zeigte jedoch keinen therapeutischen Effekt und bewies deren Unzulänglichkeit gegenüber dem Ochsenfleisch.

Der praeventive Wert von Milch wurde an einer Gruppe von 29 Patienten des Georgia-State's Sanatorium geprüft. Man verabreichte nämlich täglich 1,200 g Buttermilch zusätzlich zur Basisdiät. Mit dieser Ernährung wurde ein Jahr lang fortgefahren, und keiner der Patienten erkrankte an Pellagra, obzwar nach früheren Beobachtungen mit dieser Diät ohne Milchzugabe 40—50% der Patienten schon innert 3—8 Monaten an Pellagra hätten erkranken sollen.

Diese Beobachtungen am Menschen wiesen aber darauf hin, daß Fleisch und Milch den Antipellagrafaktor oder die Antipellagrafaktoren enthalten. Um dies weiter zu klären, führten Krehl und Mitarbeiter Versuche mit dem wichtigsten Protein des Maises, dem Zein, aus. Dabei zeigte es sich, daß bei der Verfütterung dieses Proteins eine Wachstumshemmung bei Ratten resultiert. Diese Wachstumshemmung konnte darauf zurückgeführt werden, daß die Verfütterung von Zein eine Störung im Proteinhaushalt der Ratte bewirkt. Diese Gleichgewichtsstörung zieht aber einen Mehrbedarf an Tryptophan oder Nikotinsäure nach

sich. In die gleiche Richtung wiesen auch die Versuche von Groschke und Briggs und Mitarbeiter an Kücken und Hennen. Sie konnten nämlich eine Wachstumshemmung bei diesen Tieren erzielen, indem sie ihnen Aminosäuren, wie Arginin, Lysin, Glycin und Alanin oder andere tryptophanarme Proteine in großen Mengen verfütterten. Die Ursache war wahrscheinlich auch hier in der so entstandenen Gleichgewichtsstörung zu suchen.

Es ist klar, daß das Eingreifen von solchen speziellen Aminosäuren in den komplizierten Stoffwechsel der Nikotinsäure und des Tryptophans eine Rolle bei der Aetiologie der Pellagra spielen kann.

3. Toxizitätstheorie zur Entstehung der Pellagra.

Der Italiener Lambroso war einer der ersten, der bei der Entstehung der Pellagra eine toxische Wirkung des Mais angenommen hatte. Er vermutete, daß in dem geschälten Mais sich durch Mikroorganismen eine toxische Substanz bildet, die normalerweise beim Menschen keine Symptome auslöst. Später hat auch Chick die Auffassung verworfen, wonach die Pellagra auf einem Aminosäure- oder Vitamin B₂-Mangel beruhen sollte, da er diese Theorie dem Zusammenfall der Pellagra-epidemien mit der Maiskonsumation nicht in Zusammenhang bringen konnte. Seine Auffassung war, daß sich im Mais ein toxischer Faktor befindet, der aber durch genügend Proteine und Vitamin B₂ unschädlich gemacht werden kann.

Die Theorie der toxischen Genese der Pellagra gewann wieder an Interesse, als man erkannte, daß es gewisse Stoffe gibt, die auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit der Nikotinsäure in den Stoffwechsel ihnen ähnelnder Stoffe als Antagonist wirken können. Woolley ist es gelungen, mit β -Acetylpyridin-Gaben bei Mäusen typische Erscheinungen von Nikotinsäuremangel hervorzurufen, indem er ihnen diese Substanz in einer einzelnen Dosis von 3 mg verabreicht hatte. Die Mangelsymptome konnten durch prophylaktisch verabreichte Nikotinsäure- oder Nikotinsäureamid-Dosen verhütet werden, hatten aber keinen therapeutischen Effekt. Denselben prophylaktischen Effekt hatte auch 0,1% Tryptophan in der Diät. Ebenfalls Woolley ist es gelungen, ein spezifisch-toxisches Agens aus dem Mais zu isolieren. Er konnte mit einem Chloroform und NaOH-Extrakt aus Mais bei Mäusen Diarrhoe, Erythem der Haut und der Zunge sowie Wachstumshemmung hervorrufen. Alle diese Störungen konnten dann durch Nikotinsäure oder Nikotinsäureamid behoben werden. Die weitere Abklärung dieses Toxins ist zurzeit noch ausstehend.

Nachdem aber die guten Resultate mit Nikotinsäure und Nikotinsäureamid bei der Heilung der menschlichen Pellagra bekannt wurden, hat man alle Theorien, die auf einer toxischen oder anderen Grundlage basierten, verworfen. Man bezeichnete die Pellagra als eine Vitaminmangelkrankheit, hervorgerufen durch ein Nikotinsäuredefizit.

4. Pellagra bei maisloser Ernährung.

Bis zu den Beobachtungen von Lewis und Musselmann hatte man sich vorgestellt, daß die Pellagra nur bei Individuen vorkommt, die sich vorwiegend mit Mais ernähren. Desto interessanter waren Ermittlungen dieser Autoren, die sie nach dem zweiten Weltkrieg in japanischen Gefangenenlagern gemacht hatten. Sie beobachteten bei Kriegsgefangenen, die mit einer kalorien-, Vitamin B-Komplex- und besonders an tierischem Eiweiß armen Kost ernährt wurden, pellagraähnliche Erscheinungen und andere Krankheiten wie Beriberi und Oedeme. Alle diese Erscheinungen und Krankheiten konnten durch Nikotinsäure oder nikotinsäurereiche Eiweiße behoben werden.

Entsprechende Resultate ergaben auch die experimentellen Arbeiten von Krehl und Mitarbeitern. Sie stellten zwei Parallelversuche an: den einen mit wenig Protein (15% Casein), den andern mit mehr Protein (20% Casein) in der Grundration. Dazu wurden dann noch 40% gelbe Maiskörner gegeben und versucht, deren wachstumshemmende Wirkung mit Tryptophan und Nikotinsäure aufzuheben. Bei der Ration mit hohen Proteinwerten war die Wachstumshemmung bedeutend weniger ausgeprägt als bei der mit wenig Protein. Das beruhte jedoch nicht auf der Nikotinsäuredifferenz, sondern auf dem Mehrgehalt an Lysin oder Tryptophan. Da aber bei Lysinzugaben bis zu 5,0% kein Effekt auftrat, konnte die wirksame Substanz nur Tryptophan sein, was sich durch die Versuche auch bestätigen ließ.

Ausgedehnte Untersuchungen über Pellagra bei maisloser Diät

a) Getreide- und Gemüsearten.

Neben dem Mais wurden andere Getreidearten, namentlich polierter Reis, Vollweizenmehl, raffiniertes Weizenmehl, gewalzter Hafer, Erdnußmehl und Soyabohnenmehl auf ihre wachstumshemmende Wirkung bei Ratten geprüft (Krehl). In allen diesen Versuchen wurde in bezug auf eine Maisdiät ein relativ gutes Wachstum erzielt, trotz der Tatsache, daß z. B. polierter Reis, gewalzter Hafer und Roggen weniger Nikotinsäure enthalten als Mais. Diese Resultate sind wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, daß all die aufgeführten Stoffe mit der eventuellen Ausnahme des Reises genug Tryptophan enthalten, um die Konzentration dieser Aminosäure, in der verabreichten Diät auf 150 mg% oder noch mehr, aufrechtzuerhalten. Obzwar Reis weniger Nikotinsäure und nur wenig mehr Tryptophan enthält als Mais, hat man mit der Reiszusatzkost merkwürdigerweise die besten Wachstumsergebnisse erzielt. Im allgemeinen wiesen diese Versuche darauf hin, daß die Ratten auch bei einer nikotinsäurefreien Kost gut wachsen, falls die Diät 0,1% Tryptophan enthält. Bei einer Maisdiät müßte aber dieses Tryptophanminimum auf 0,15% erhöht werden, oder es würden die Nikotinsäuremangelerscheinungen manifest.

b) *Kohlehydrate.*

Auch der Kohlehydrat-Gehalt in der Nahrung wurde von Krehl in Versuchen mit Ratten untersucht, indem er der wachstumshemmenden Maisdiät Glucose, Dextrose und Lactose zusetzte. Es zeigt sich, daß die Wachstumshemmung dieser Kohlehydrat-Zusatzdiäten weniger ausgeprägt war als die der Maisernährung ohne Kohlehydrate. Krehl konnte auch in denselben Arbeiten die Wachstumshemmung verhütende Wirkung der Milch, wie sie schon von Goldberger und Tanner beschrieben wurde, bestätigen. Diese Wirkung der Milch ist eventuell auch auf die darin befindliche Lactose zurückzuführen, da die in den gegebenen Milchrationen sich befindlichen Tryptophanmengen so gering waren, daß sie kaum eine Wirkung haben konnten.

c) *Maislose Diät mit minderwertigen Proteinen.*

Da die wachstumshemmende Wirkung des Maises auf die im Mais enthaltenen tryptophanarmen Proteine zurückzuführen war, versuchte Krehl mit der Verfütterung anderer tryptophanarmer Proteine diese Vermutungen zu bestätigen. Zu diesem Zwecke diente die tryptophanarme Gelatine. In Tat und Wahrheit ließen sich auch die gleichen Erscheinungen wie bei der Maisdiät bei der Gelatine-Verfütterung beobachten. Es kam zu Wachstumshemmung, die durch Zugabe von Nikotinsäure behoben werden konnte. Die gleichen Nikotinsäuremangelerscheinungen konnte Briggs bei nikotinsäurefreier Kost oder Gelatine-Diät auch bei Hühnern hervorrufen.

d) *Bedeutung der Zusammensetzung des Nahrungseiweißes.*

Krehl hat gezeigt, daß ein Zusatz von Eialbumin, Fibrin und präpariertem Soyabohnenglobulin — also Eiweißkörper, die praktisch keine Nikotinsäure enthalten — in einer Konzentration von 15% die wachstumshemmende Wirkung des Maises aufheben. Später hat sich herausgestellt, daß der Tryptophangehalt des zusätzlich verfütterten Eiweißes für die Aufhebung der Wachstumshemmung verantwortlich ist.

Die Beteiligung der Darmflora an der Nikotinsäuresynthese

Die Wechselwirkung zwischen Tryptophan und Nikotinsäure beruht auf zwei theoretischen Möglichkeiten:

1. Entweder wird Nikotinsäure im Gastrointestinaltrakt durch Bakterien synthetisiert,
2. oder im tierischen Gewebe wird Nikotinsäure aus Tryptophan synthetisiert.

Hankes beobachtete bei seinen Versuchen mit Ratten, daß zwischen den im Kot ausgeschiedenen Nikotinsäuremengen und dem Wachstum

der Ratten eine Beziehung besteht. Andererseits konnte er auch nachweisen, daß die Nikotinsäuresynthese nur im oberen Darmabschnitt erfolgt.

Aus den Arbeiten von Ellinger wurde bekannt, daß beim Nikotinsäurehaushalt des Menschen die Darmflora eine eminente Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, daß 80 % des Tagesbedarfes an Nikotinsäure im Darm synthetisiert wird. Diese Beobachtungen wurden auch unterstützt durch bisherige Erfahrungen, wonach man mit Milch den Nikotinsäuremangel beheben kann. Danach würde Milch die Intestinalflora und damit die Nikotinsäuresynthese aus Milchproteinen begünstigen.

Nach den beschriebenen Beobachtungen liegt es aber auf der Hand, daß grundlegende Änderungen in der Ernährung auch Änderungen in der intestinalen Bakterienflora bewirken, was wieder zu einer Begünstigung oder aber auch Beeinträchtigung der Nikotinsäuresynthese im Darmtrakt führen kann. Danach würden aber auch bestimmte grundlegende Nahrungsänderungen einen ätiologischen Faktor bei der Pellagra bedeuten.

Nachdem die Stoffwechselbeziehungen zwischen Tryptophan und Nikotinsäure gesichert waren und es auch klar war, daß dabei die Darmflora eine bedeutende Rolle spielt, versuchte Krehl die Beziehungen zwischen Tryptophangehalt in der Nahrung und Tryptophangehalt im Feces und Urin zu klären. Die Bemühungen wiesen darauf hin, daß Nikotinsäure die Ausnützung des in der Nahrung sich befindlichen Tryptophans durch das Gewebe von 30 % auf 70 % erhöhen kann.

Die Tryptophanzufuhr könnte danach bei Maisdiät dadurch wachstumsfördernd wirken, daß sie in die Nikotinsäuresynthese eingreift; erstens wird infolgedessen vermehrt Nikotinsäure für das Gewebewachstum zugeführt; zweitens bewirkt die gebildete Nikotinsäure eine bessere Ausnützung des Tryptophans.

Hundley konnte bei Nikotinsäure-Tryptophanmangel-Syndrom, verbunden mit Wachstumshemmung eine verminderte Nikotinsäuresynthese und Abnahme der Nikotinsäure im Gewebe beobachten. Danach aber würde die Nikotinsäuresynthese eine Einsparung von Nikotinsäure auf Kosten des Nikotinsäuregehaltes des Gewebes bewirken.

Auch Roberts und Najjar sowie Ellinger haben bei pellagrakranken Menschen die Ausscheidungsverhältnisse von Nikotinsäure beobachtet. Es zeigte sich, daß es bei Pellagrakranken zu einer verminderten Nikotinsäureausscheidung kommt.

Sarett und Goldsmith fanden eine verminderte H-methylnicotinamidausscheidung bei Menschen, welche sich vorwiegend mit maishaltiger Kost ernährten hatten. Im Gegensatz zu solchen, die an Stelle von Mais Vollweizen aßen. Ferner konnten sie feststellen, daß bei zusätzlicher Verabreichung von Tryptophan die Ausscheidung von N-methylnicotinamid erhöht wurde; daraus schlossen sie, daß Tryptophan eine Vorstufe zu N-methylnicotinamid ist.

Einfluß von Pyridoxin auf den Tryptophanstoffwechsel

Lepkovsky und Nielsen beobachteten, daß Pyridoxinmangel auf den Tryptophanstoffwechsel störend einwirkt, indem von der Norm abweichende Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden, wie z. B. statt Kynurensäure, Xanthurensäure. In diesem Zusammenhang hat Rosen den Tryptophanstoffwechsel bei Ratten bei pyridoxinfreier Kost studiert. Er konnte zeigen, daß bei Ratten mit pyridoxinloser Kost die N-methylnicotinamidausscheidung im Urin geringer war als bei den Kontrolltieren, und daß im Urin Xanthurensäure erscheint. Nachdem man den Mangeltieren Pyridoxin zugeführt hat, sind die durch den gestörten Tryptophanstoffwechsel im Urin erschienenen Xanthurensäuremengen geringer geworden, aber die Verminderung der N-methylnicotinamidausscheidung ließ sich sogar noch nach längerer Zeit nicht beheben. Den gleichen Effekt hatte der Autor auch bei Zugabe von Pyridoxal. Ein Verlust von Nicotinsäureamid konnte nicht beobachtet werden, und die Autoren nehmen an, daß die bei Pyridoxin- und Pyridoxalmangel entstehende Xanthurensäure nicht auf Kosten des Tryptophan-Nikotinsäurestoffwechsels geschieht.

Zu gleicher Zeit haben Schweigert und Pearson im Gegensatz zu Rosen darauf hingewiesen, daß die pyridoxinarne Diät bei Ratten und Mäusen die Umwandlung von Tryptophan zu Nikotinsäure und ihren Derivaten hemmt. Weiter konnten Junqueira und Schweigert zeigen, daß die Rückkehr zur normalen N-nicotinamidausscheidung nach Zugabe von Pyridoxin zur Diät davon abhängig ist, wie lange die Ratten vorher an pyridoxinloser Diät gehalten wurden. Sie konnten bei Ratten sogar nach 41 Tage langer pyridoxinloser Ernährung eine Rückkehr der normalen N-nicotinsäureamidausscheidung bewirken.

Ling hat auf Grund von Rattenversuchen berichtet, daß bei Tieren, die pyridoxinreich ernährt wurden, nach Tryptophaninjektion die Totalpyridinnucleotidwerte in den Erythrocyten stiegen, nicht aber bei Ratten, die pyridoxinarm ernährt wurden.

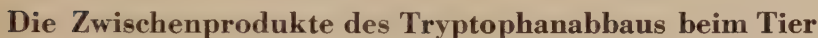
Die Injektion von Nikotinsäure ergab keine signifikante Änderungen in den Totalpyridinnucleotidwerten der Erythrocyten. Daraus ist aber ersichtlich, daß Pyridoxin bei der Umwandlung von Tryptophan in Nikotinsäurederivate benötigt wird, nicht aber bei der Entstehung der Pyridinnucleotide bei der Nikotinsäuresynthese.

Der Umwandlungsmechanismus von Tryptophan in Nikotinsäure

Wie oben ausgeführt, läßt sich zeigen, daß perorale oder intraperitoneale Verabreichung von Tryptophan eine Vermehrung der Nikotinsäureausscheidung zur Folge hat, was auf eine Umwandlung von Tryptophan in Nikotinsäure im tierischen Gewebe hindeutet.

Durch Genschädigung mittels Ultraviolett- oder Röntgenbestrahlung lassen sich Mutanten von *Neurospora crassa* erzeugen, die auf die Zu-

Bildung und Abbau des Tryptophans soll bei Neurospora folgendermaßen verlaufen:



Mitchell und Mitarbeiter wiesen nach, daß 3-Oxyanthranilsäure sowohl bei Ratten wie bei *Neurospora* als Vorstufe für Nikotinsäure dienen kann. Es zeigte sich, daß die benötigten Mengen ziemlich große sind und daß sie eher Tryptophan als Nikotinsäure ersetzen. Es stellte sich nämlich heraus, daß bei Applikation von nur 10 mg% 3-Oxyanthranilsäure kein Wachstum erfolgt; bei 2 mg% Nikotinsäure oder 100 mg Tryptophan und auch bei 100 mg% 3-Oxyanthranilsäure kommt es dagegen zum Wachstum.

Krehl und Bonner haben die Rolle des Kynurenins, der Kynuren-säure, der Anthranilsäure und der 3-Oxyanthranilsäure bei der Umwandlung von Tryptophan in Nikotinsäure geprüft. Sie haben die aufgezählten Stoffe Nikotinsäuremangelratten 5 Tage lang intraperitoneal injiziert; dabei fanden sie, daß 10 mg 3-Oxyanthranilsäure die gleiche Wirkung haben wie 10 mg l-Tryptophan oder 1 mg Nicotinsäureamid. l- und dl-Kynurenin waren nach 5tägiger Applikation in täglichen Dosen von 10 mg unwirksam. Die Injektion von 100 mg% Anthranilsäure hat sogar die Mangelsymptome etwas gesteigert.

Aus Versuchen von O. Wiss und Mitarbeitern geht jedoch hervor, daß dl-Kynurenin bei täglicher subcutaner Verabreichung während mehreren Wochen bei Nikotinsäuremangelratten eine deutliche Wachstumswirkung zur Folge hat.

Die Autoren haben den auf Mangelkost gesetzten Tieren täglich 20 mg dl-Kynurenin in ca. 1 ccm Wasser gelöst subcutan gespritzt. Parallel wurden Vergleichstiere in entsprechender Weise mit 0,5 mg Nikotinsäure bzw. 5mg 3-Oxyanthranilsäure behandelt. Der Vergleich der mittleren Gewichtszunahme zeigte deutlich die wachstumsfördernde Wirkung sowohl von Nicotinsäure, 3-Oxyanthranilsäure, als auch von dl-Kynurenin.

Ohne Zusatz		0,5 mg Nikotin-säure per Tag		20 mg dl-Kynu-renin per Tag		5 mg 3-Oxyanthranil-säure per Tag	
Tierzahl	Mittlere Gewichtszu-nahme in g	Tierzahl	Mittlere Gewichtszu-nahme in g	Tierzahl	Mittlere Gewichtszu-nahme in g	Tierzahl	Mittlere Gewichtszu-nahme in g
5	19	5	102	5	70	5	103

Daneben wurden Blut und Leber auf Nikotinsäuregehalt geprüft, und es zeigte sich, daß sowohl bei Nikotinsäure, Tryptophan, 3-Oxyanthranilsäure, als auch bei Kynureninapplikation die Nikotinsäurewerte des Blutes gestiegen waren, die der Leber aber nur bei Nikotinsäure und Tryptophaninjektion, nicht aber bei Applikation von 3-Oxyanthranilsäure und dl-Kynurenin.

Versuch mit Isotopen-Signierungen

Der endgültige Beweis der Tryptophan-Nikotinsäureumwandlung wurde durch Isotopen-Signierungen erbracht. Hundley und Bond verfütterten mit C^{13} markierte Nikotinsäure und fanden 95.7% der verfütterten C^{13} in dem ausgeschiedenen N-methylnicotinamid. Aus diesen Versuchen wurde ersichtlich, daß fast alles N-methylnicotinamid aus der verfütterten Nikotinsäure und den körpereigenen Vorräten kam. Daraus folgt aber, daß bei genügender Zufuhr von Nikotinsäure keine Nikotinsäuresynthese aus Tryptophan erfolgt.

Heidelberger¹ und Mitarbeiter waren die ersten, die Versuche angestellt haben mit Tryptophan, das in der Seitenkette am β -Kohlenstoffatom radioaktiven Kohlenstoff enthielt. Es wurden aus dem Urin Kynurenin, Kynurensäure und N-methylnicotinamid isoliert. Der radioaktive Kohlenstoff wurde in Kynurenin und in Kynurensäure gefunden, nicht aber in N-methylnicotinamid. Wenn N-methylnicotinamid durch Oxydation aus Kynurensäure entstanden wäre, hätte man den radioaktiven Kohlenstoff auch da finden müssen.

Heidelberger² verfütterte Ratten DL-Tryptophan $3\ C^{14}$ und isolierte aus dem Harn N-methylnicotinamid. In dieser Verbindung wurde C^{14} in der Carboxylgruppe nachgewiesen, was darauf hinweist, daß die Nikotinsäure durch Abbau der Seitenkette des Kynurenins gebildet wird.

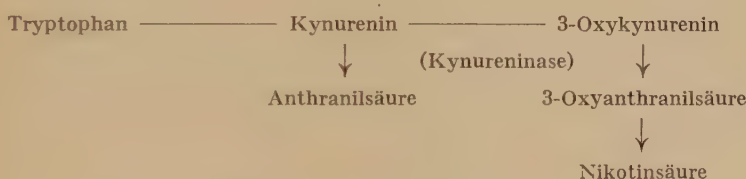
Die an der Umwandlung von Tryptophan zu Nikötinsäure beteiligte Kynureninase

Die erste Beobachtung stammt von Kotake und Nakayama. Sie stellten fest, daß aus Tryptophan im tierischen Organismus neben Kynureninsäure auch Anthranilsäure entstehen kann. Es gelang auch, den Abbau von Kynurenin zu Anthranilsäure mit Hilfe von Leberextrakt *in vitro* nachzuweisen.

Wiss und Mitarbeiter zeigten, daß die Anthranilsäure durch Aufspaltung der Seitenkette zwischen dem β - und γ -Kohlenstoff unter Al-anilinbildung entsteht.

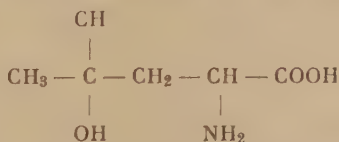
Zum gleichen Ergebnis gelangten unabhängig davon Braustein und Mitarbeiter. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß das Enzym spezifisch auf die l-Form des Kynurenins eingestellt und zur Wirksamkeit Phosphation notwendig ist. Pyridoxalphosphat hat einen aktivierenden Einfluß.

Neben Kynurenin werden eine große Anzahl anderer Verbindungen durch die sogenannte Kynureninase in analoger Weise gespalten. Von Bedeutung ist die Tatsache, daß auch das Oxykynurenin gespalten wird, woraus hervorgeht, daß dieses Ferment an der Umwandlung des Tryptophans zur Nikotinsäure beteiligt ist.



Eigene Untersuchungen

Neben den früher untersuchten Verbindungen: Kynurenin, Oxykynurenin, β -Benzoylalanin, β -Acetylalanin, Nitrokynurenin, α -amino- γ -oxyphenylbuttersäure und α -amino- γ -oxyvaleriansäure wurde Hydroleucin auf Spaltbarkeit durch die Kynureninase untersucht. Im Hinblick auf die Tatsache, daß neben α -amino- γ -Ketoverbindungen auch die entsprechenden Oxyverbindungen, nämlich α -amino- γ -oxyphenylbuttersäure abgebaut werden, schien es uns von Interesse, zu unter-



suchen, ob auch Oxyleucin gespalten wird, und hofften dadurch einen Hinweis zu erhalten, ob die -Oxydverbindungen vor der Spaltung zu Ketosäure dehydriert oder direkt zerlegt werden. Die Tatsache, daß bei

Oxyleucin eine Dehydrierung zu Ketosäure nicht in Frage kommt und andererseits eine Spaltung nicht nachweisbar ist, scheint für eine primäre Dehydrierung zu sprechen.

Hemmversuche zur Abklärung der Frage, welche Teilstruktur für die Affinität des Substrates zum Enzym verantwortlich ist, zeigten, daß der cyclische Anteil in dieser Hinsicht offensichtlich wichtig ist.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms wurde untersucht, ob die verschiedenen Substrate um das Enzym konkurrieren, d. h. ob eines oder mehrere Enzyme für den Abbau in Betracht kommen. Wird der Abbau von Kynurenin und β -Benzoylalanin bzw. Acetylalanin, in dieser Weise verglichen, so zeigt sich, daß keine Summierung der Abbauwerte in Frage kommt. Es handelt sich somit um ein einheitliches Ferment.

Experimenteller Teil

1. Alaninbestimmung.

Als Maß der Enzymwirkung dient das abgespaltene Alanin, welches nach der Methode von O. Wiss (Helvetica Chimica Acta, 1948, Vol. XXXI, S. 22—26) bestimmt wird.

M e t h o d e.

a) Reagentien.

Pikrinsäurelösung nach van Slyke. Eine wässrige gesättigte Lösung wird so verdünnt, daß zur Titration von 20 ccm Lösung, bei Verwendung von Phenolphthalein als Indikator, 8,73 ccm 0.1-n. NaOH benötigt werden.

0,2%ige Lösung von Natriumbisulfit

Kaltgesättigte, wässrige Lösung von Piperazin

4%ige wässrige Lösung von Natriumnitroprussid (unmittelbar vor Gebrauch frisch bereiten)

0,5%ige Stärkelösung

0,1-n. Jodlösung

0,02-n. Natriumthiosulfatlösung

Gesättigte Natriumbicarbonatlösung

Ninhydrin.

b) Apparatur.

Nach Lieb-Zacherl, hergestellt von Paul Haack, Wien, später von E. Keller & Co., Basel.

c) Desaminierung.

1 ccm Rattenleberextrakt mit 5 ccm Pikrinsäurelösung in einem kleinen Zentrifugenglas zu mischen und zu zentrifugieren. 5 ccm, d. h. die gesamte überstehende Flüssigkeit werden in den Reaktionskolben gegeben und mit 100 mg Ninhydrin und einer Spatelspitze Bims-

steinpulver versetzt. Als Vorlage werden 3 ccm Bisulfitlösung in das Ansatzgefäß gegeben. Die Gefäße werden an den Apparat angeschlossen, die Reaktionslösung wird zum Sieden erhitzt und 20 Minuten so belassen, während ein schwacher Luftstrom den gebildeten Acetaldehyd in die Vorlage saugt.

d) *Photometrische Bestimmungen.*

Das überschüssige Bisulfit der Vorlage wird unter Zugabe von einem Tropfen Stärkelösung mit 0.1-n. Jodlösung eben bis zur Blaufärbung titriert. Das überschüssige Jod wird mit 0,02-n. Thiosulfat bis zur Entfärbung reduziert.

Die so behandelte Vorlage wird quantitativ in ein graduiertes Reagensglas von 10 ccm Inhalt übergeführt. Nach Zusatz von 0,6 ccm Natriumbicarbonatlösung wird auf 6 ccm aufgefüllt, 1,5 ccm Piperazinlösung und 0,5 ccm Natriumnitroprussidlösung zugegeben. Die Farbintensität erreicht nach 2—3 Minuten ein Maximum, das ca. eine Minute bestehen bleibt, so daß die photometrische Bestimmung unmittelbar nach Zugabe der Reagentien vorgenommen werden muß. Aus dem gleichen Grund wird gegen Wasser als Vergleichswert photometriert, und die Extinktion des Leerwertes bei jeder Bestimmung kontrolliert, indem 3 ccm unbehandelte Bisulfitlösung, wie oben beschrieben, verarbeitet und von den Analysenwerten abgezogen werden. Die Bestimmung erfolgt mit dem Pulfrich-Stufenphotometer bei 20 mm Schichtdicke mit Filter S. 57.

e) *Berechnung.*

Bei Verwendung von 1 ccm Rattenleberextrakt wird das Alanin nach folgender Gleichung berechnet:

$$\gamma\text{-Alanin/1ccm Rattenleberextrakt} = \frac{E \cdot 460 \cdot 6}{5,5} = E \cdot 501,8$$

2. *Bereitung der Enzymlösung.*

Zur Herstellung des Enzyms haben wir weibliche Ratten verwendet. Einjährige weibliche Ratten wurden 24 Stunden lang auf Hunger gesetzt, nachher getötet und die Leber frei präpariert. Die frische Rattenleber wurde dann mit Quarzsand im Porzellanmörser homogenisiert unter Zusatz des dem doppelten Lebergewicht entsprechenden Phosphatpuffers bei pH 8-8,2. Das so gewonnene Homogenat wurde dann erst 20 Minuten und nachher 10 Minuten bei 3500 Touren zentrifugiert und die überschüssige Flüssigkeit im Dialysierschlauch gegen einen Phosphatpuffer von ebenfalls pH 8-8,2 24 Stunden lang im Eisschrank bei 1—2° C dialysiert, wobei der Puffer nach vier, sechs und zehn Stunden gewechselt wurde.

3. Abbauprobungen.

In Erlenmeyerkolben von 50 ccm Volumen werden je 10 ccm der Enzymlösung zugegeben; ein Ansatz dient als Leerkontrolle, den übrigen wird das zu untersuchende Substrat zugegeben.

Jeder Ansatz wird mit einem Tropfen Octylalkohol versetzt, mit Gummistopfen verschlossen und bei 38° C gehalten. Nach 2, 4, 6, 10 und 24 Stunden wird je 1 ccm entnommen und darin nach oben beschriebener Methode der Alaningehalt bestimmt.

4. Hemmprobungen.

Hemmprobungen werden in analoger Weise angesetzt:

1. Ansatz enthält 10 ccm Extrakt
2. Ansatz enthält 10 ccm Extrakt + Substrat
3. Ansatz enthält 10 ccm Extrakt + Hemmsubstanz
4. Ansatz enthält 10 ccm Extrakt + Substrat + Hemmsubstanz

Ergebnisse

1. Abbauprobungen mit Kynurenin, β -Benzoylalanin, β -Acetylalanin, γ -Hydroxy-leucin als Substanz.

Aus folgenden Tabellen und Kurven geht hervor, daß unter den gewählten Bedingungen Kynurenin und β -Benzoylalanin stark abgebaut werden, daß bei β -Acetylalanin nur in den ersten Stunden der Abbau deutlich zum Ausdruck kommt (Tab. I. Kurve 1—2) und das Hydroxy-leucin nicht angegriffen wird (Tab. II, Kurve 3).

TABELLE I.

Abbauprobung mit: Kynurenin m/600, β -Benzoylalanin m/600,
 β -Acetylalanin m/600 Konzentration.

Alaningehalt in γ /ccm	Enzym	Enzym + m/600 Kynurenin	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin	Enzym + m/600 β -Acetylalanin
nach 2 h	4,5 γ /ccm	29,0 γ /ccm	34,0 γ /ccm	30,0 γ /ccm
nach 4 h	5,0 γ /ccm	75,0 γ /ccm	46,0 γ /ccm	32,0 γ /ccm
nach 10 h	53,0 γ /ccm	182,0 γ /ccm	136,0 γ /ccm	44,0 γ /ccm
nach 24 h	54,0 γ /ccm	176,0 γ /ccm	166,0 γ /ccm	98,0 γ /ccm

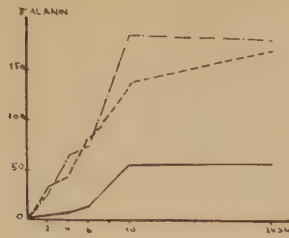
TABELLE II.

Abbauprobungen mit: γ -Hydroxy-leucin m/600 Konz.

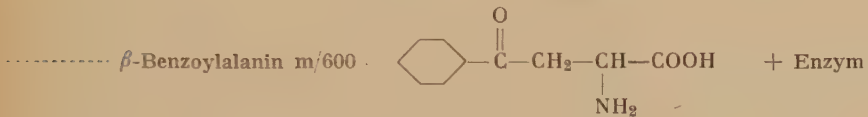
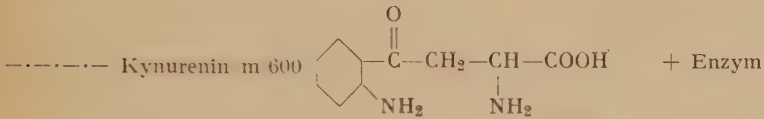
Alaningehalt in γ /ccm	Enzym	Enzym + m/600 γ -Hydroxy-leucin
nach 2 h	20,0 γ /ccm	20,0 γ /ccm
nach 4 h	34,0 γ /ccm	35,0 γ /ccm
nach 10 h	60,0 γ /ccm	65,0 γ /ccm
nach 24 h	134,0 γ /ccm	183,0 γ /ccm

Kurve 1.

Abbaukurve von Kynurenin m/600, β -Benzoylalanin m/600 Konz.

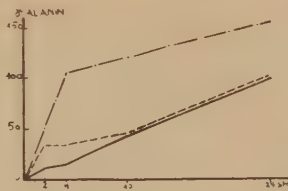


———— Enzym ohne Zusatz

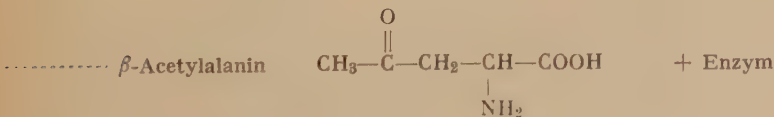
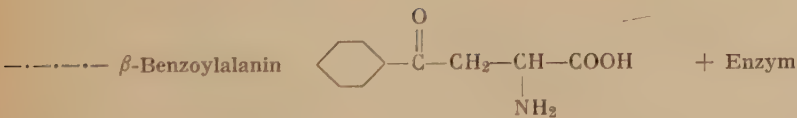


Kurve 2.

Abbaukurve von β -Acetylalanin, m/600, β -Benzoylalanin m/600 Konz.

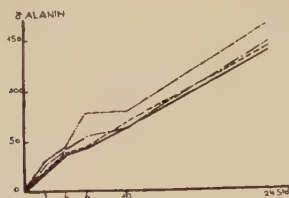


———— Enzym ohne Zusatz



Kurve 3.

Abbaukurve von γ -Hydroxyleucin m/600 Konz.



———— Enzym ohne Zusatz

----- γ -Hydroxyleucin m/600 $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{OH} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \quad \quad \quad \text{NH}_2 \end{array}$ + Enzym

- · - · - · Methallylglycin m/600 + Enzym

· · · · · α -amino- γ -dimethylbutyrolaceton m/600 + Enzym

2. Konkurrenzversuche zwischen Kynurenin und β -Benzoylalanin.

Aus den Zahlen und den Kurven (Tab. III—IV und Kurve 4—5) ist ersichtlich, daß eine deutliche Konkurrenzwirkung stattfindet, so daß die Annahme berechtigt ist, daß für den Abbau ein einziges Enzym verantwortlich ist.

TABELLE III.

Konkurrenzwirkung mit β -Benzoylalanin m/600 Konz.

Alanin in γ /ccm	Enzym	Enzym + m/600 Kynurenin	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin + m/600 Kynurenin	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin
nach 2 h	44,0 γ /ccm	74,0 γ /ccm	72,0 γ /ccm	54,0 γ /ccm
nach 6 h	67,0 γ /ccm	154,0 γ /ccm	128,0 γ /ccm	82,0 γ /ccm
nach 24 h	112,0 γ /ccm	258,0 γ /ccm	242,0 γ /ccm	226,0 γ /ccm

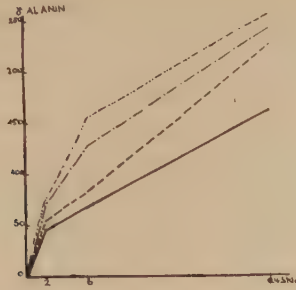
TABELLE IV.

Keine Konkurrenzwirkung mit β -Acetylalanin m/600 Konz.

Alanin in γ /ccm	Enzym	Enzym + m/600 Kynurenin	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin + m/600 Kynurenin	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin
nach 2 h	20,0 γ /ccm	50,0 γ /ccm	52,0 γ /ccm	28,0 γ /ccm
nach 4 h	34,0 γ /ccm	74,0 γ /ccm	84,0 γ /ccm	55,0 γ /ccm
nach 6 h	48,0 γ /ccm	106,0 γ /ccm	84,0 γ /ccm	58,0 γ /ccm
nach 24 h	112,0 γ /ccm	194,0 γ /ccm	202,0 γ /ccm	170,0 γ /ccm

Kurve 4.

Konkurrenzwirkung zwischen β -Benzoylalanin und Kynurenin.



———— Enzym ohne Zusatz

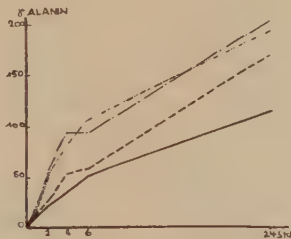
----- β -Benzoylalanin m 600 O=C(Cc1ccccc1)CNC(=O)O + Enzym

- · - · - Kynurenin und β -Benzoylalanin + Enzym

..... Kynurenin m 600 O=C(Cc1ccccc1)CNC(=O)O + Enzym

Kurve 5.

Keine Konkurrenzwirkung zwischen β -Acetylalanin und Kynurenin.



———— Enzym ohne Zusatz

----- β -Acetylalanin m/600 CC(=O)CNC(=O)O + Enzym

..... Kynurenin m/600 O=C(Cc1ccccc1)CNC(=O)O + Enzym

- · - · - Kynurenin und β -Acetylalanin + Enzym

3. Hemmversuche:

Nitrokynurenin, Benzoylacrylsäure haben sowohl auf den Kynurenin- als auch auf den β -Benzoylalanin-Abbau eine starke hemmende Wirkung (Tab. Va, b — VI a, b und Kurve 6, 7, 8, 9). β -Acetylalanin wirkt nur schwach (Tab. VII und Kurve 10) und α -Amino- γ -dimethylbutyrolacton überhaupt nicht hemmend (Tab. VIII und Kurve 11).

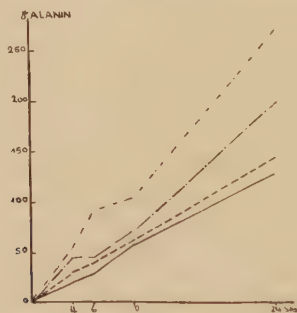
TABELLE V.

Hemmversuch: Nitrokynurenin in m/200 und m/1000 Konz. auf Kynurenin m/600.

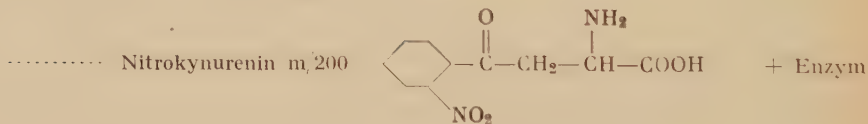
a) Nitrokynurenin in m/200 Konz.			
Alaninwert in γ /ccm	Enzym	Enzym+m/600 Kynurenin	Enzym+m/600 Kynurenin+m/200 Nitrokynurenin
nach 2 h	18,0 γ /ccm	55,0 γ /ccm	45,0 γ /ccm
nach 6 h	27,0 γ /ccm	90,0 γ /ccm	44,0 γ /ccm
nach 10 h	57,0 γ /ccm	103,0 γ /ccm	70,0 γ /ccm
nach 24 h	125,0 γ /ccm	268,0 γ /ccm	197,0 γ /ccm
b) Nitrokynurenin in m/1000 Konz.			
Alaninwert in γ /ccm	Enzym	Enzym+m/600 Kynurenin	Enzym+m m 600 Kynurenin+m/1000 Nitrokynurenin
nach 2 h	16,0 γ /ccm	37,0 γ /ccm	22,0 γ /ccm
nach 4 h	21,0 γ /ccm	57,0 γ /ccm	41,0 γ /ccm
nach 6 h	47,0 γ /ccm	78,0 γ /ccm	54,0 γ /ccm
nach 10 h	98,0 γ /ccm	129,0 γ /ccm	110,0 γ /ccm
nach 24 h	126,0 γ /ccm	302,0 γ /ccm	208,0 γ /ccm

Kurve 6.

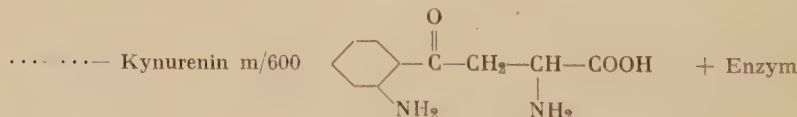
Hemmung des Kynurenins m/600 durch Nitrokynurenin m/200 Konz.



———— Enzym ohne Zusatz

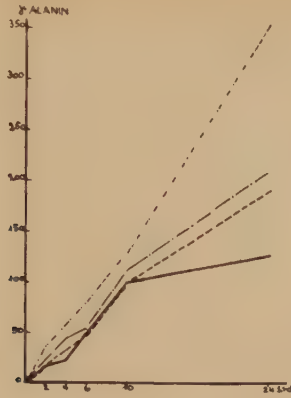


- · - · - Kynurenin + Nitrokynurenin + Enzym



Kurve 7.

Hemmung des Kynureninabbaus m/600 durch Nitrokynurenin m/1000 Konz.



———— Enzym ohne Zusatz

----- Nitrokynurenin m 1000 O=C(NC(=O)C1CCCCC1[N+](=O)[O-])C(=O)O + Enzym

- · - · - Kynurenin + Nitrokynurenin + Enzym

····· Kynurenin m/600 + Enzym

TABELLE VI.

Hemmversuch mit Benzoylacrylsäure in m/1000 Konz. auf den Kynureninabbau und in m/200 Konz. auf den β -Benzoylalaninabbau.

a) Benzoylacrylsäure in m/1000 Konz. auf Kynurenin.

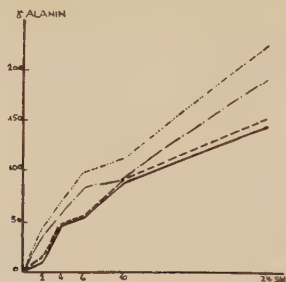
Alanin in γ ccm	Enzym	Enzym + m/600 Kynurenin	Enzym + m/600 Kynu- renin + m/1000 Ben- zoylacrylsäure
nach 2 h	10,0 γ /ccm	45,0 γ /ccm	34,0 γ /ccm
nach 4 h	44,0 γ /ccm	72,0 γ /ccm	60,0 γ /ccm
nach 6 h	54,0 γ /ccm	100,0 γ /ccm	74,0 γ /ccm
nach 10 h	90,0 γ /ccm	113,0 γ /ccm	92,0 γ /ccm
nach 24 h	141,0 γ /ccm	224,0 γ /ccm	190,0 γ /ccm

b) Benzoylacrylsäure in m/200 Konz. auf β -Benzoylalanin.

Alanin in γ ccm	Enzym	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin	Enzym + m/600 β -Benzoylalanin + m/200-Benzoyl- acrylsäure
nach 2 h	39,0 γ /ccm	66,0 γ /ccm	42,0 γ /ccm
nach 4 h	71,0 γ /ccm	112,0 γ /ccm	76,0 γ /ccm
nach 6 h	100,0 γ /ccm	148,0 γ /ccm	112,0 γ /ccm
nach 24 h	167,0 γ /ccm	276,0 γ /ccm	174,0 γ /ccm

Kurve 8.

Hemmung des Kynureninabbaus durch Benzoylacrylsäure in m/1000.



———— Enzym ohne Zusatz

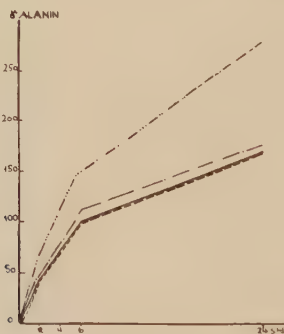
----- Benzoylacrylsäure m/1000 O=C(C=C)C1CCCCC1 + Enzym

- · - · - Kynurenin + Benzoylacrylsäure + Enzym

····· Kynurenin m/600 NC(=O)CC(N)C(=O)O + Enzym

Kurve 9.

Hemmung des β -Benzoylalaninabbaus durch Benzoylacrylsäure m/200 Konz.



———— Enzym ohne Zusatz

----- Benzoylacrylsäure m 200 O=C(C=C)C1CCCCC1 + Enzym

- · - · - β -Benzoylalanin + Benzoylacrylsäure + Enzym

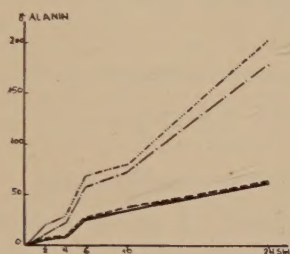
····· Benzoylalanin m 600 NC(=O)CC(N)C(=O)O + Enzym

TABELLE VII.

Hemmversuch mit β -Acetylalanin m/200 auf β -Benzoylalanin m/200 Konz.

Alanin in γ /ccm	Enzym	Enzym + β -Benzoyl- alanin m/200	Enzym + β -Benzoyl- alanin m/200 + β -Acetylalanin m/200
nach 2 h	6,0 γ /ccm	20,0 γ /ccm	12,0 γ /ccm
nach 4 h	10,0 γ /ccm	29,0 γ /ccm	24,0 γ /ccm
nach 6 h	27,0 γ /ccm	68,0 γ /ccm	58,0 γ /ccm
nach 10 h	34,0 γ /ccm	78,0 γ /ccm	72,0 γ /ccm
nach 24 h	60,0 γ /ccm	203,0 γ /ccm	177,0 γ /ccm

Kurve 10.

Hemmung des β -Benzoylalaninabbaus durch β -Acetylalanin in m/200 Konz.

————— Enzym ohne Zusatz

----- β -Acetylalanin m/200 $\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ + Enzym

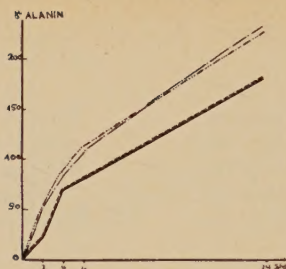
- · - · - β -Benzoylalanin + β -Acetylalanin + Enzym

····· β -Benzoylalanin m 200 $\text{C}_6\text{H}_{11}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$ + Enzym

TABELLE VIII.

Hemmversuch mit α -amino- γ -Dimethylbutyrolacton in m/1000 Konz.
auf Kynurenin in m/600 Konz.

Alanin in γ /ccm	Enzym	Enzym + m 600 Kynurenin	Enzym + m/600 Kynu- renin + m/1000 α -amino - γ -Dimethylbuty- rolacton
nach 2 h	24,0 γ /ccm	51,0 γ /ccm	51,0 γ /ccm
nach 4 h	70,0 γ /ccm	84,0 γ /ccm	88,0 γ /ccm
nach 6 h	80,0 γ /ccm	107,0 γ /ccm	112,0 γ /ccm
nach 24 h	178,0 γ /ccm	231,0 γ /ccm	226,0 γ /ccm

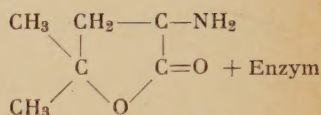


———— Enzym ohne Zusatz

----- α -Amino — γ -Dimethylbutyrolacton m/1000

..... Kynurenin + α -Amino — γ -Dimethylbutyrolacton + Enzym

-.-.-.- Kynurenin m/600 + Enzym



Zusammenfassung

1. Das kynureninabbauende Ferment Kynureninase spaltet neben Kynurenin auch β -Benzoylalanin mit gleicher Intensität.
2. β -Acetylalanin wird in viel geringerem Ausmaß abgebaut.
3. Nitrokynurenin und γ -Hydroxyleucin werden nicht angegriffen.
4. Zwischen Kynurenin und β -Benzoylalanin, bzw. Kynurenin und Acetylalanin findet eine Konkurrenzierung statt, so daß angenommen werden muß, daß ein einziges Enzym für den Abbau verantwortlich ist.
5. Nitrokynurenin und Benzoylacrylsäure sind kräftige Inhibitoren der Kynureninase, während β -Acetylalanin nur eine gering hemmende Wirkung hat.

Literaturverzeichnis

- Albert, P. W., Scheer, P. T., Deuel, H. J. jr., Journ. of Bio. Chem. 175, 479—480 (1948).
 Aykroyd, W. R., Swaminathan, M., Ind. Journ. Med. Research 47, 667—677 (1940).
 Beadle, G. W., Mitchell, Nyc, J. F., Proc. Nat. Acad. Sci. US 33, 155—158 (1947).
 Bonner, D., Beadle, G. W., Arch. Biochem. 11, 319—328 (1946).
 Bonner, D., Proc. Nat. Acad. Sci. US 34, 5—9 (1948).
 Briggs, G. M., u: Mitarbeiter, Journ. of Nutr. 32, 659—675 (1946).
 Briggs, G. M., Journ. of Bio. Chem. 161, 749—750 (1945).
 Butenandt, Weidel, Weichert, Vonderjugin, Zschr. Phys. Chem. 1943, 27.
 Chick, H., Lancet 225, 341—346 (1933).
 Ellinger, P., Journ. of Bio. Chem. 40, 31—34 (1946).
 Ellinger, P., Benesch, R., Kay, W. W., Lancet 284, 432—444 (1945).
 Ellinger, P., Zschr. Phys. Chem. 1904/05, 325.
 Ellinger, P., Matsuoka, Zschr. Phys. Chem. 1920, 259.
 Goldberger, J., Tanner, W. F., US Publ. Health Reports 31, 462—486 (1922).
 Goldberger, J., Tanner, W. F., US Publ. Health Reports 39, 87—107 (1924).

- Goldberger, J., Tanner, W. F., US Publ. Health Reports 40, 54—80 (1925).
- Goldberger, J., Tanner, W. F., US Publ. Health Reports 39, 87—101 (1924).
- Groschke, A. C., Briggs, G. M., Journ. of Bio. Chem. 165, 739—740 (1946).
- Handler, P., Zschr. f. Vitaminforsch. XIX/Hs. Huber (1948).
- Hankes, L. V., u. Mitarbeiter, Journ. of Bio. Chem. 174, 873—881 (1948).
- Harris, Seale, Clinic. Pellagra 1941, Mosby Co., St. Louis (Miss.).
- Hauser, Solomin, Josephson, Americ. Journ. of Physiol. 1898, Bd. 2, S. 1.
- Heidelberger, C., (1) Gullberg, M. E., Morgan, A. F., Lepkovsky, S., Journ. of Bio. Chem. 175, 471—472 (1948).
- Heidelberger, C., (2) Abraham, E. P., Lepkovsky, Journ. of Bio. Chem. 176, 1461—1462 (1948).
- Hundley, J. M., Journ. of Nutr. 34, 253—262 (1947).
- Hundley, J. M., Bond, H. W., Journ. of Bio. Chem. 173, 513—517 (1948).
- Junqueira, B. P., Schweigert, P. S., Journ. of Bio. Chem. 174, 605—610 (1948 a).
- Kotake, Y., Zschr. d. Phys. Chem. 1931, 206.
- Kotake, Y., Iwao, Zschr. d. Phys. Chem. 1931, 141.
- Kotake, Y., Nakayama, Zschr. d. Phys. Chem. 1941, 76.
- Kotake, Y., Nakayama, Zschr. d. Phys. Chem. 1941, 86.
- Krehl, W. A., Teply, L. J., Elvehjem, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 58, 334—337 (1945 a).
- Krehl, W. A., Teply, L. J., Elvehjem, Science 101, 283—285 (1945).
- Krehl, W. A., Sarma, P., Teply, L. J., Elvehjem, Journ. of Nutr. 31, 85—106 (1946).
- Krehl, W. A., Sarma, P., Teply, L. J., Elvehjem, Science 101, 489—490 (1945).
- Krehl, W. A., Sarma, P., Elvehjem, Journ. of Bio. Chem. 162, 403—411 (1946).
- Krehl, W. A., Sarma, P., Teply, L. J., Elvehjem, Journ. of Bio. Chem. 162, 303—311 (1946).
- Krehl, W. A., De la Huerca, Elvehjem, Journ. of Bio. Chem. 164, 551—561 (1946).
- Krehl, W. A., Henderson, L. M., De la Huerca, Journ. of Bio. Chem. 166, 531—540 (1946).
- Krehl, W. A., Bonner, D., in Krehl, Vitam. u. Hormon, Vol. VII, S. 140 (1948).
- Lepkovsky, S., Nielsen, E., Journ. of Bio. Chem. 144, 135—138 (1942).
- Lewis, C. F., Musselmann, M. M., Journ. of Nutr. 32, 549—558 (1946).
- Ling, C. T., Hegsted, D. M., Stare, F. J., Journ. of Bio. Chem. 174, 803—812 (1948).
- Matsuoka, Joshimatsu, Zschr. d. Phys. Chem. 1925, 206.
- Mitchell, Nyc, J. F., Owen, R. D., Journ. of Bio. Chem. 175, 433—438 (1948).
- Mitchell u. Mitarbeiter, Journ. of Bio. Chem. 175, 433—438 (1948).
- Najjar, V. A., Wood, R. W., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 44, 386—390 (1940).
- Rosen, F., Huff, J. W., Perlzweig, Journ. of Nutr. 33, 561—567 (1947).
- Sarett, H. P., Goldschmith, G. A., Journ. of Bio. Chem. 167, 293—294 (1947).
- Sasaki, Journ. of Bio. Chem. 1923, 251.
- Schaefer, A. E., u. Mitarbeiter, Journ. of Bio. Chem. 144, 679—685 (1942).
- Shell, E. E., Wright, L. D., Journ. of Bio. Chem. 140, 119—120 (1941).
- Schweigert, P. S., Pearson, P. B., Journ. of Bio. Chem. 168, 555—561 (1947).
- Tatum, E. L., Bonner, D., Proc. Natl. Acad. Sci. US 30, 30—37 (1944).
- Tatum, E. L., u. Mitarbeiter, Arch. Biochem. 3, 477—478 (1944).
- Wiß, O., Vioillier, G., Müller, M., Helv. Chim. Acta 32, 771—775 (1950).
- Wiss, O., Hatz, F., Helv. Chim. Acta, 1949, 530.
- Wiss, O., Helv. Chim. Acta, 1949, 1694.
- Wiss, O., Helv. Chim. Acta, 1948, 23.
- Woolley, D. W., Journ. of Bio. Chem. 157, 455—459 (1945).
- Woolley, D. W., Journ. of Bio. Chem. 162, 179—180 (1946).
- Woolley, D. W., Journ. of Bio. Chem. 163, 773—774 (1946).

